

PCT/JP96/03349

25.12.96

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1 9 9 5 年 1 1 月 1 5 日

RECEIVED	07 MAR 1997
FILED	PCT

出 願 番 号
Application Number:

平成 7 年特許願第 3 1 9 8 2 5 号

出 願 人
Applicant (s):

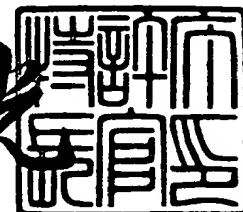
生化学工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1 9 9 7 年 2 月 2 1 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

荒井 寿光



出証番号 出証特平 0 9 - 3 0 0 6 2 1 3

【書類名】 特許願
【整理番号】 P-23599
【提出日】 平成 7年11月15日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明の名称】 光架橋ヒアルロン酸ゲルおよびその製造法
【請求項の数】 8

【発明者】

【住所又は居所】 東京都東村山市野口町3丁目35番地10

【氏名】 脇 道典

【発明者】

【住所又は居所】 東京都立川市砂川町6丁目10番地の23 メゾンプロ
スペリテ201号

【氏名】 宮本 建司

【特許出願人】

【識別番号】 000195524

【氏名又は名称】 生化学工業株式会社

【代表者】 山谷 渉

【代理人】

【識別番号】 100073874

【弁理士】

【氏名又は名称】 萩野 平

【電話番号】 03-5561-3990

【代理人】

【識別番号】 100081075

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐々木 清隆

【電話番号】 03-5561-3990

【代理人】

【識別番号】 100066429

【弁理士】

【氏名又は名称】 深沢 敏男

【電話番号】 03-5561-3990

【代理人】

【識別番号】 100093573

【弁理士】

【氏名又は名称】 添田 全一

【電話番号】 03-5561-3990

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008763

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9200915

【書類名】 明細書

【発明の名称】 光架橋ヒアルロン酸ゲルおよびその製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 周波数10Hzにおける貯蔵弾性率（ G' ）が50～1500 Pa、損失弾性率（ G'' ）が10～300 Pa、および損失正接（ G''/G' ）が0.1～0.8であることを特徴とする光架橋ヒアルロン酸ゲル。

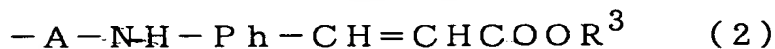
【請求項2】 架橋点がヒアルロン酸の構成2糖単位当たり0.1～0.5%であることを特徴とする光架橋ヒアルロン酸ゲル。

【請求項3】 光反応性架橋基としてスペーサーを含むケイ皮酸誘導体を結合した光反応性ヒアルロン酸誘導体の該光反応性架橋基同士が架橋シクロブタン環を形成することよりなる網目構造に水性媒体を含むハイドロゲルであることを特徴とする請求項1または2に記載の光架橋ヒアルロン酸ゲル。

【請求項4】 光反応性架橋基が下記一般式（1）または（2）で表されることを特徴とする請求項3記載の光架橋ヒアルロン酸ゲル。



（式中、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子または低級アルキル基、Phはフェニル基、 n は2～18の整数を表す。）



（式中、 R^3 は低級アルキル基、Aは $-(\text{NHCR}^4\text{R}^5\text{CO})_m-$ または $-\text{NH}(\text{CR}^4\text{R}^5)_h\text{CO}-$ を表し、該 R^4 および R^5 はそれぞれ独立に水素原子または低級アルキル基を表す。 $-\text{Ph}-$ はパラフェニレン基、 m は1～6の整数を、 h は1～18の整数を表す。）

【請求項5】 光反応性架橋基がヒアルロン酸の構成2糖単位当たり0.05～10%導入されていることを特徴とする請求項3または4記載の光架橋ヒアルロン酸ゲル。

【請求項6】 光反応性架橋基を結合した光反応性ヒアルロン酸誘導体を0.5～10重量%含む水性媒体溶液に紫外線を照射して、該光反応性架橋基同士に架橋シクロブタン環を形成させて、網目構造とする請求項1～5のいずれか1項に記載の光架橋ヒアルロン酸ゲルの製造方法。

【請求項7】 請求項1～5のいずれか1項に記載の光架橋ヒアルロン酸ゲルからなる医用材料。

【請求項8】 癒着防止効果を有することを特徴とする請求項7記載の医用材料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、架橋シクロブタン環を形成し、網目構造を有する、生体適合性の、光架橋ヒアルロン酸ゲル、その製造法及びその医療上の用途に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

ヒアルロン酸は動物組織中に存在し、生体適合性及び生体内分解性を有し、物性的には、非常に吸水性に優れ、粘性も高い。

ヒアルロン酸を化学修飾し、何らかの方法で架橋させ、網目構造を形成すると、粘性の他に、粘弾性を帯びる。これに水が含有したものがハイドロゲルになる。

【0003】

この架橋されたヒアルロン酸は、結合様式にかかわらず見かけ上巨大分子を形成し、これら架橋の度合いを調整することで生体内分解性をコントロールできる。

架橋形式には種々のものがあり、疎水結合やイオン結合を利用して架橋するものとして、ヒアルロン酸に求核試薬を導入することによる架橋（特表平3-502704）やヒアルロン酸のエステル化による疎水結合での架橋（USP 4, 851, 521）、あるいは多価イオンによるイオン結合での架橋（EP 0507604 A2）が知られている。これらは、共有結合に比べ弱い結合力で架橋しているため、pH、イオン強度、温度等の外的変化に対し影響を受け易く、又、医用材料として使用する際の生体内での残留性は短く、ヒアルロン酸の生体内効果を維持できる様な残留性をコントロールすることはむずかしい。

【0004】

また、ヒアルロン酸分子間を共有結合で結ぶものとして、ジビニルスルホンによる架橋（特公平4-30961）、エポキシドによる架橋（特表昭61-502729、特開平5-140201）などがあるがいずれも架橋剤、架橋化合物が有毒だけでなく、ジビニルスルホン、エポキシド等がヒアルロン酸に導入されると同時に架橋と共に三次元網目構造が構成され架橋ヒアルロン酸ゲル自身は水等の溶媒に対して不溶化し、この網目構造の中に取り込まれた未反応の低分子化合物の分離除去は困難であった。

【0005】

一方、紫外線照射による光架橋反応でのヒアルロン酸の架橋（特開平6-73102）によれば、光架橋前の光反応性架橋基を導入した光反応性ヒアルロン酸誘導体が水に可溶性であり、この時点ではまだ三次元網目構造は構成されていないので未反応低分子化合物の除去が容易に行なえ、ついで光反応自体がクリーンな反応で未反応の低分子化合物が生じずに光架橋ヒアルロン酸誘導体を得ることができ、また形成された架橋構造は共有結合のため、架橋度をコントロールすることにより光架橋ヒアルロン酸誘導体の残留性の制御も容易であった。

【0006】

また、光架橋ヒアルロン酸誘導体を医用材料として用いる時に、例えば、癒着防止材として従来ではフィルム状のものが用いられてきたが、これでは生体組織の細部の癒着を防止することは困難であり、注入可能な光架橋ヒアルロン酸ゲルが望まれていた。

しかしながら、本発明の光架橋ヒアルロン酸ゲルおよびその製法は知られていなかった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

従来の方法で得られた架橋ヒアルロン酸のハイドロゲルは、未反応低分子化合物等の不純物の除去が困難であり、またハイドロゲルの物性のコントロールも困難であった。さらに該ゲルの製造も条件設定等が困難であった。

本発明の第1の目的は、光反応性架橋基を導入した光反応性ヒアルロン酸誘導

体の該光反応性架橋基同士が架橋シクロブタン環を形成することよりなる網目構造に水性媒体を含む光架橋ヒアルロン酸ゲル及びそれを容易に製造する方法を提供することであり、第2に安全性、生体適合性に優れかつ生体内分解性を有する、光架橋ヒアルロン酸ゲルからなる注入可能な医用材料を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意研究の結果、上記課題を以下の構成によって達成することに成功した。

すなわち本発明は、

1) 周波数10Hzにおける貯蔵弾性率(G')が50~1500Pa、損失弾性率(G'')が10~300Pa、および損失正接(G''/G')が0.1~0.8であることを特徴とする光架橋ヒアルロン酸ゲル、

2) 架橋点がヒアルロン酸の構成2糖単位当たり0.1~0.5%であることを特徴とする光架橋ヒアルロン酸ゲル、

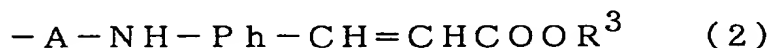
3) 光反応性架橋基としてスペーサーを含むケイ皮酸誘導体を結合した光反応性ヒアルロン酸誘導体の該光反応性架橋基同士が架橋シクロブタン環を形成することよりなる網目構造に水性媒体を含むハイドロゲルであることを特徴とする上記1)または2)に記載の光架橋ヒアルロン酸ゲル、

4) 光反応性架橋基が下記一般式(1)または(2)で表されることを特徴とする上記3)に記載の光架橋ヒアルロン酸ゲル。

【0009】



(式中、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子または低級アルキル基、Phはフェニル基、nは2~18の整数を表す。)



(式中、 R^3 は低級アルキル基、Aは $-(\text{NHCR}^4\text{R}^5\text{CO})_m-$ または $-\text{NH}(\text{CR}^4\text{R}^5)_h\text{CO}-$ を表し、該 R^4 および R^5 はそれぞれ独立に水素原子または低級アルキル基を表す。 $-\text{Ph}-$ はパラフェニレン基、mは1~6の整数を、hは1~18の整数を表す。)

5) 光反応性架橋基がヒアルロン酸の構成2糖単位当たり0.05~10%導入されていることを特徴とする上記3)または4)記載の光架橋ヒアルロン酸ゲル、

6) 光反応性架橋基を結合した光反応性ヒアルロン酸誘導体を0.5~10重量%含む水性媒体溶液に紫外線を照射して、該光反応性架橋基同士に架橋シクロブタン環を形成させて、網目構造とする上記1)~5)のいずれか1項に記載の光架橋ヒアルロン酸ゲルの製造方法、

7) 上記1)~5)のいずれか1項に記載の光架橋ヒアルロン酸ゲルからなる医用材料、および

8) 癒着防止効果を有することを特徴とする上記7)記載の医用材料を提供するものである。

【0010】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において光架橋ヒアルロン酸誘導体は、光反応性架橋基を結合した光反応性ヒアルロン酸誘導体の該光反応性架橋基同士が架橋シクロブタン環を形成し、網目構造を有するものを含む概念である。また、本発明において光架橋ヒアルロン酸ゲルは、光架橋ヒアルロン酸誘導体の網目構造（三次元網目構造）に水性媒体を含むハネドゲルを含む概念である（以下、本発明の光架橋ヒアルロン酸ゲルを「本発明のゲル」ともいう）。

【0011】

本発明のゲルは、第一にその物性を粘弾性の観点から特定したものであり、第二にさらに架橋構造を架橋点という観点から特定したものである。

本発明で使用する光反応性ヒアルロン酸誘導体の光反応性架橋基としては、ケイ皮酸、又はその置換体、カルボキシエチルチミン、クマリン等から誘導される基であって、紫外線により二量化し、シクロブタン環を形成できるビニレン基を有したものであれば制限はなく、中でも特にケイ皮酸から誘導される基が導入されている光反応性架橋基が好ましい。又、上記光反応性架橋基としては、更にケイ皮酸等とヒアルロン酸との間に導入できる二つ以上の官能基を有するスペーサーが結合されている様な光反応性架橋基を用いることが好ましい。スペーサーと

しては、アミノ酸又はその誘導体、ペプチド、アミノアルコール等、2つ以上の官能基を有し、両者を結合させる化合物であれば特に制限はないが、中でもアミノアルコールが望ましい。構造上光反応性架橋基がヒアルロン酸のどの官能基に導入されていてもよいが、特にウロン酸のカルボキシル基に導入されていることが好ましい。例えば、スペーサーとしてアミノアルコールを用いた場合、アミノアルコールの水酸基とケイ皮酸のカルボキシル基がエステル結合で結ばれており、該アミノアルコールのアミノ基がヒアルロン酸のカルボキシル基とアミド結合で結ばれている様な構造等が好ましく、またスペーサーとしてアミノ酸もしくはペプチドを用いた場合、これらのカルボキシル基とアミノケイ皮酸のアミノ基がアミド結合で結ばれており、該アミノ酸もしくはペプチドのアミノ基がヒアルロン酸のカルボキシル基とアミド結合で結ばれている様な構造等が好ましい。

【0012】

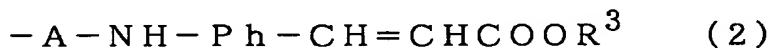
好ましいスペーサーが結合されている光反応性架橋基としては、具体的には下記一般式(1)または(2)で表される光反応性架橋基等が挙げられる。



式(1)中、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子または低級アルキル基(好ましくは、炭素数1~4)を表す。 Ph はフェニル基を示すが、炭素数1~4程度の低級アルキル基もしくはアルコキシ基、アミノ基または水酸基等の置換基を有していてもよい。 n は2~18、好ましくは、2~12の整数を表す。

【0013】

式(1)の該光反応性架橋基は、例えばヒアルロン酸のカルボキシル基とアミド結合して光反応性ヒアルロン酸誘導体を形成する。



式(2)中、 R^3 は低級アルキル基、好ましくは、炭素数1~8のアルキル基を表す。 A は $-(\text{NHCR}^4\text{R}^5\text{CO})_m-$ または $-\text{NH}(\text{CR}^4\text{R}^5)_h\text{CO}-$ を表す。該 R^4 および R^5 はそれぞれ独立に水素原子または低級アルキル基(好ましくは、炭素数1~4)を表す。 $-\text{Ph}-$ はパラフェニレン基を示すが、炭素数1~4程度の低級アルキル基もしくはアルコキシ基、または水酸基等の置換基を有していてもよい。 m は1~6、好ましくは、1~3の整数を、 h は1~18、好ま

しくは1~12の整数を表す。

【0014】

本発明に使用されるヒアルロン酸としては、特に制限はないが通常、重量平均分子量1~500万のものが使用され、目的に応じて種々の分子量のものが選定されるが、好ましくは50~300万、さらに好ましくは80~250万のものが挙げられる。以下の合成法においては、アルカリ金属塩（ナトリウム塩、カリウム塩等）およびアルカリ土類金属塩（カルシウム塩等）等の水溶性ヒアルロン酸塩が好適に使用されるが、用いる反応溶媒に溶解し、反応を阻害しない限り、他の塩であっても遊離型であってもよい。

【0015】

本発明で使用する光反応性ヒアルロン酸誘導体は、ヒアルロン酸を例えば水単独または水混和性有機溶媒（例えば、ジオキサン、ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン、アセトアミド、アルコール（メタノール、エタノール等）またはピリジン等）を含んだ水溶液等に溶解し、例えばカルボジイミド法によって、水溶性カルボジイミド（例えば、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC・HCl）、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドメチオシド、1-シクロヘキシル-3-（2-モルホリノエチル）カルボジイミド塩酸塩等）と縮合補助剤（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール等）の存在下、光反応性架橋基を導入することにより製造できる。

【0016】

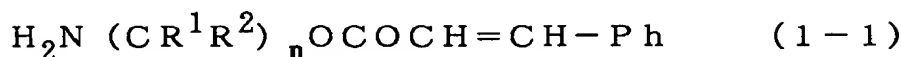
反応後の精製はエタノール沈澱法、透析といった常法にて行われ、乾燥後267nmの吸光度を測定する事によりDS（Degree of Substitution、ヒアルロン酸の構成2糖単位当たりの光反応性架橋基導入率）を求めることができる。

光反応性ヒアルロン酸誘導体および光架橋ヒアルロン酸ゲルの調製にあたり、使用する試薬、水、容器等に注意を払うことで無菌でしかも実質的にエンドトキシンフリーの化合物を得ることができる。

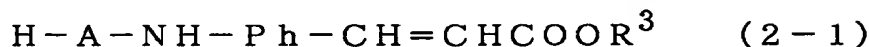
【0017】

該光反応性架橋基のヒアルロン酸への具体的導入に使用される化合物としては

、例えば次式(1-1)または(2-1)が挙げられる。



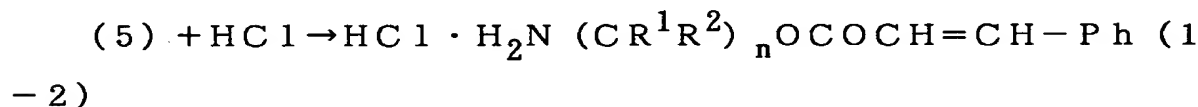
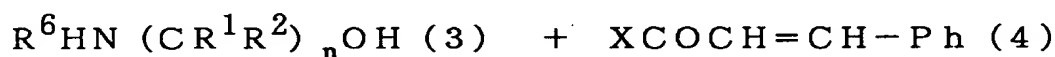
式(1-1)中、 R^1 、 R^2 、 Ph 、 n は前記と同義である。



式(2-1)中、 A 、 $-\text{Ph}-$ 、 R^3 は前記と同義である。また、化合物(1-1)および(2-1)は塩の形態、例えば、塩酸塩、臭化水素塩またはフッ化水素塩が好ましく、特に塩酸塩が好ましい。

【0018】

化合物(1-1)の塩酸塩(1-2)は、具体的には以下の反応により合成することができる。



ここで、 R^6 は酸で切断可能なアミノ保護基、例えば、 t -ブトキシカルボニル基等、 X は塩素原子等のハロゲン原子である。

【0019】

ここで、化合物(1-2)は、具体的には以下のように合成される。

化合物(3)にクロロホルム等の有機溶媒を加え、氷冷下、トリエチルアミン等の有機塩基を加え、化合物(4)、4-ジメチルアミノピリジン等の塩基性触媒を順次加える。室温で攪拌した後、この反応液に酢酸エチル等の有機溶媒を加え、弱酸性水溶液で数回、水、弱アルカリ性水溶液で数回、水、飽和食塩水等で分液洗浄した後、有機溶媒層を無水硫酸ナトリウム等で乾燥する。無水硫酸ナトリウム等を濾取し、濾液を減圧乾燥して化合物(5)を得る。

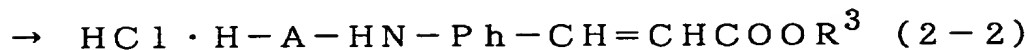
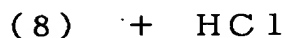
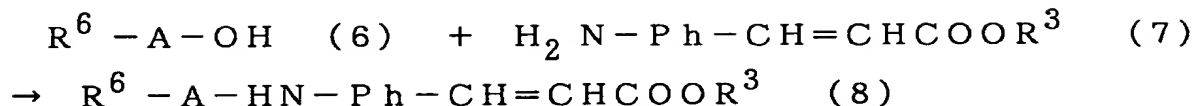
【0020】

化合物(5)に1~5M塩化水素/ジオキサン等の有機溶媒溶液等を氷冷下に加え攪拌する。エーテル等の有機溶媒を加え、析出した結晶を濾取し、さらに有機溶媒で洗浄し、減圧乾燥し、化合物(1-2)を得る。

又、化合物(2-1)の塩酸塩(2-2)は、具体的には、以下の反応により

合成することができる。

【0021】



ここで、 R^3 、 R^6 は上述と同義である。

【0022】

化合物(2-2)は、更に具体的には、例えば以下のように合成される。

化合物(6)にクロロホルム等の有機溶媒を加え、氷冷下、トリエチルアミン等の有機塩基の存在下、塩化ジメチルホスフィノチオイル等の活性化剤を加え、化合物(6)のカルボキシル基を活性化させる。化合物(6)を活性化させた後、トリエチルアミン等の有機塩基の存在下、氷冷下で化合物(7)を加え、室温にて攪拌する。この反応液に酢酸エチル等の有機溶媒を加え、弱酸性水溶液で数回、水、弱アルカリ性水溶液で数回、水、飽和食塩水等で分液洗浄した後、有機溶媒層を無水硫酸ナトリウム等で乾燥する。無水硫酸ナトリウム等を濾取し、濾液を減圧乾燥して化合物(8)を得る。

【0023】

化合物(8)に1～5M塩化水素／ジオキサン等の有機溶媒溶液等を氷冷下に加え攪拌する。エーテル等の有機溶媒を加え、析出した結晶を濾取し、さらに有機溶媒で洗浄し、減圧乾燥し、化合物(2-2)を得る。

スペーサーを光反応性架橋基中に組み入れることにより、これら光反応性架橋基を導入したヒアルロン酸誘導体の光反応性は大きく向上する。光反応性の向上はスペーサーの持つ自由度、疎水結合性に依存するが、このような光反応の感度向上により従来困難であった光反応性架橋基のより低い導入率での光架橋が可能である。

【0024】

上記のような光反応性ヒアルロン酸誘導体を光照射により架橋する場合、従来はまずフィルムを形成し、それに紫外線を照射する事により光架橋ヒアルロン酸

フィルムとしていた。フィルムは紫外線を透過しやすいばかりでなく、フィルム形成中の脱水あるいは水の蒸発により光反応性架橋基自身の持つ疎水性のため光反応性架橋基同士が互いに近づき合う配向をとり、この様に形成された場が光反応に有利に働くと考えられていた。例えば、光反応性架橋基がケイ皮酸の場合、ケイ皮酸同士が4オングストローム(Å)の距離にある時に特定波長の紫外線を照射されると二量化、すなわち架橋するがそれ以外の分子間距離では二量化しないとされているため、光反応性架橋基同士が近接する配向のとれるフィルム形成は光反応には重要な工程と考えられていた。又、ケイ皮酸のトランス体は、上記条件で紫外線が照射されると二量化するが、幾何異性体のシス体は不活性と言われている。この様な光反応性ヒアルロン酸誘導体の水溶液に紫外線を照射すると通常、水分子の阻害により光反応性架橋基同士が適切な接近が出来ず、二量化より異性化の方が優先して進行し、架橋は困難と考えられていた。

【0025】

本発明者らは、高濃度の光反応性ヒアルロン酸誘導体水溶液を調製し、その溶液層を紫外線の透過し易い形状にし、それに紫外線照射することにより光架橋ヒアルロン酸ゲルが生成することを見い出した。

本発明において光照射時の水性媒体中における光反応性ヒアルロン酸誘導体の溶液濃度(以下、「光反応濃度」という)は0.5重量%~10重量%程度が好ましく、分子量100万程度の光反応性ヒアルロン酸誘導体を使用する場合、更に好ましくは1重量%~4重量%が良く、これ以上薄いと後述のように異性化が優先し、逆に濃すぎると均一に調製することが困難になる。

【0026】

すなわち、該規定の濃度よりさらに希薄な溶液では上記のように異性化体が優先して生成し、更に、紫外線を照射し続けるとその紫外線の影響のためヒアルロン酸の糖鎖自体が切断され、低分子化してしまう。この様な事からもヒアルロン酸の糖鎖に影響を与えず、効率的な光架橋反応が進行する反応場を与える事は重要であり、該規定濃度溶液の調製は必須である。図1は水性媒体中における光架橋の概念図を示したもので、(a)は希薄溶液中の光反応性ヒアルロン酸誘導体を示し、光反応性架橋基同士が水分子の阻害により架橋できる分子配置をとれず

異性化が優先する。(b)は該規定濃度溶液中の光反応性ヒアルロン酸誘導体を示し、光反応性架橋基同士が水分子の阻害を希薄溶液中ほど受けないため、疎水性の高い光反応性架橋基が互いに疎水結合力で引き合い架橋に必要な分子配置をとり、水性媒体を抱き込んだまま二量化、架橋するものと考えられる。これらの規定濃度溶液の架橋には、特に先に記述したスペーサーを結合した光反応性架橋基を導入した光反応性ヒアルロン酸誘導体を用いることが、光反応性が向上するので好ましい。

【0027】

上記光反応濃度は、ヒアルロン酸に導入される光反応性架橋基の導入率(DS、Degree of Substitution)に依存する。DSは、ヒアルロン酸の構成2糖単位当たりの光反応性架橋基導入率(%)で算出され、例えば、2糖当たり1個の該架橋基が導入されていれば、DSは100%、200糖に1個導入されていればDS1%となる。DSが低いほど同じ条件で光照射しても架橋の割合は低い。

【0028】

本発明において上記光反応濃度で架橋反応させるには原料のヒアルロン酸の分子量によるがDSは0.05~10%が挙げられ、例えば分子量が50万以上のヒアルロン酸の場合、DSが0.3~5%、好ましくは0.5~3%であることが望ましい。

光照射時の光反応性ヒアルロン酸誘導体溶液の水性媒体としては、水、緩衝液、生理的食塩水、緩衝化生理的食塩水等が挙げられるが、医用材料に用いる場合は特に緩衝液、生理的食塩水、緩衝化生理的食塩水が好ましい。水性媒体が水以外の場合の媒体及び各溶質濃度は、本発明のゲルの物性値の微妙な制御に使用され得ると共に目的に応じて適宜選定され得る。

【0029】

該光反応性ヒアルロン酸誘導体溶液は、通常、その合成反応系から分離、精製された該光反応性ヒアルロン酸誘導体を水性媒体に溶解して調製されるが、場合により、光反応性ヒアルロン酸誘導体溶液は、該光反応性ヒアルロン酸誘導体の合成反応系をそのままあるいは濃縮して使用することも可能である。

光すなわち紫外線の照射においては、紫外線の種類は特に制限されないが、通

常、光反応に必要な波長を含む、200～600nm、好ましくは200～450nmの光源（例えば、高圧水銀灯またはメタルハライドランプ等）を使用し、紫外線カットフィルター等（例えばパイレックスガラス（商品名）等）により二量化反応に好ましくない短波長をカットしたものをを用いて数分間の照射で行うことができる。

【0030】

紫外線照射時の光反応性ヒアルロン酸誘導体溶液の形状およびそれを受容する容器の形状、素材は紫外線を透過する形状、素材であれば特に制限はなく、層状、チューブ状、シリンジ状等が挙げられる。架橋反応の均一性を考えると紫外線を均一に十分に透過する形状が良く、特に薄層状にした溶液層への紫外線照射によれば均一な架橋ゲルが得られる。容器は光反応性ヒアルロン酸誘導体溶液、ひいては生成される本発明のゲルを光反応系内に保持可能な形状であればよく、必ずしも密閉された空間であることを要せず、例えば、単なる板状のものも含むが、好ましくは、本発明のゲルの使用まで無菌的に保管でき、使用時に適宜取り出せる形状が挙げられる。

【0031】

上記の範囲で光反応濃度を変化させると同じDSの光反応性ヒアルロン酸誘導体でも架橋シクロブタン環を形成する割合すなわち架橋率は変化し、種々の物性にも変化をきたす。光反応濃度が高いほど架橋率は増加すると考えられ、粘弾性を測定すると弾性体としての性質が増加し、架橋率の増加と共に網目構造が密になってくる。また光架橋ヒアルロン酸ゲルの架橋シクロブタン環の存在割合は、DSと架橋率との積である架橋点として定義され、ヒアルロン酸の構成2糖単位当たりの二量化体のモル比（％）として表現できる。好ましい架橋点としては、ヒアルロン酸の構成2糖単位当たり0.1～0.5（％）の範囲が挙げられる。

【0032】

又、光架橋ヒアルロン酸ゲルを乾燥したもの（以下、乾燥ゲルということがあ
る）の吸水率も架橋の程度により影響され架橋の程度を示すことができる。吸水率は下記の式で表される。

$$\text{吸水率（％）} = \text{吸収した水分重量} / \text{乾燥ゲル重量} \times 100$$

架橋の程度すなわち架橋率が増加すると網目構造は密になり、水の取り込みは少なくなり、吸水率は低下する。乾燥ゲルの吸水率は、水性媒体を生理食塩水（0.9%塩化ナトリウム水溶液）とし、24時間の浸潤後、測定した時、20～150（×100%）程度を挙げることができ、好ましくは30～120（×100%）、さらに好ましくは40～100（×100%）が挙げられる。

【0033】

また、本発明のゲルとしては、光架橋ヒアルロン酸誘導体をヒアルロン酸含量として0.5～10重量%含むゲルが挙げられ、特に分子量100万程度の光反応性ヒアルロン酸誘導体を使用した光架橋ヒアルロン酸ゲルの場合、1～4重量%が好ましい。

また、ゲルの物性を粘弾性で示すのに、貯蔵弾性率（ G' ）、損失弾性率（ G'' ）および損失正接（ $\tan \delta$ ；（ G''/G' ））の値が用いられる。すなわち貯蔵弾性率が高く、損失弾性率が低いとき弾性が強く、硬いゲルになる。逆に損失弾性率が高く、貯蔵弾性率が低いとき粘性の強いゲルになる。

【0034】

本発明のゲルは、周波数10Hzにおいて貯蔵弾性率（ G' ）が50～1500Pa、好ましくは100～500Pa、損失弾性率（ G'' ）が10～300Pa、好ましくは50～150Paおよび損失正接（ $\tan \delta$ ；（ G''/G' ））が0.1～0.8、好ましくは0.2～0.5の範囲の物性を示す。

本発明において、光反応濃度、紫外線照射時間等の光反応条件あるいはDSを選定することにより希望する粘弾性等の物性を持つ光架橋ヒアルロン酸ゲルが調製できる。

【0035】

本発明のゲルは、光照射によって得られたゲルを乾燥等の方法で脱水後、所望量の水性媒体を加え再膨潤させ、上記物性範囲とすることも可能である。

本発明のゲルを医用材料に用いることは、非常に有用である。ヒアルロン酸の持つ高い生体適合性と架橋によって新たに加わった特性である生体内での残留性の延長、粘弾性等の物理化学的性質の改善は医療領域での用途に適している。

【0036】

たとえば、本発明のゲルを癒着防止材として使用する場合、ゲルの弾性の増加は組織間のバリアー効果、生体内残留性を向上させ、粘性の増加は組織付着性、患部への注入のしやすさを向上させると考えられるので両者のバランスに優れたゲルが好ましい。G' が1500を越えるか、あるいは損失正接が0.1に満たないと、弾性が高く、いわゆる硬く、脆いゲルになり、患部への注入が困難になる。また、G' が50に満たないかあるいは損失正接が0.8を越えると、粘性が高くなり、いわゆる溶液状となり、好ましい硬さが得られず、癒着防止効果に必要なバリアー効果が消失してしまう。

【0037】

即ち、例えば手術後に起こる臓器癒着は、臨床的にみても好ましくなく、このような観点からも有用な癒着防止材の出現が望まれているのである。癒着防止材として望まれる特性に1) 癒着する臓器間をバリアーする効果があること、2) 創傷部を被覆できること、3) 創傷治癒を遅延させないこと、4) 創傷部の治癒する期間残留でき、好ましくは治癒後に生体内で分解、吸収されること、5) 無害、無毒であり生体適合性があること等が挙げられる。光架橋によって得られた生体適合性に優れた光架橋ヒアルロン酸ゲルは、この特性を満たし、特に重要なバリアー効果は架橋ゲルの物理化学的性質により、又、生体内での残留性は、光架橋による網目構造の形成により得られる。

【0038】

又、本発明のゲルの持つ不定形性は注入可能なシリンジタイプの成形を可能にし、細部の患部（例えば創傷部等）にも注入できる。本発明のゲルは、溶液よりは、はるかに高い弾性を持つが、シリンジを通過できないほどの硬さを持たないこともその特徴に挙げられる。又、直径の小さなチューブを通しての患部への注入も可能であり、マイクロサージェリー等への応用も期待できる。

【0039】

本発明における光架橋ヒアルロン酸ゲルは3次元網目構造を持ち、その網目内に薬剤を含有させれば有用な薬剤徐放剤となり得る。ゲル中に薬剤を含有させる方法としては、乾燥ゲルを薬剤の含まれる溶液中に浸漬させる方法、又、光架橋による架橋後には精製が不要であることから、光反応性ヒアルロン酸誘導体溶液

に薬剤を含有させた後、光架橋させる方法があり、どちらを用いても良い。

【0040】

【実施例】

以下、本発明の具体的実施例を説明するが、本発明は、これに限定されるものではない。

製造例 1

光反応性ヒアルロン酸誘導体 (DS 0.53%) の合成

ヒアルロン酸ナトリウム (生化学工業 (株) 製、重量平均分子量 95 万) 10 g (25 mmol 2 糖単位) を水 1.5 l に溶解させた後、1, 4-ジオキサンを 750 ml 加えた。氷冷下、N-ヒドロキシスクシンイミド 288 mg (2.5 mmol) / ジオキサン溶液 50 ml、EDC · HCl 240 mg (1.25 mmol) / 水溶液 50 ml、HCl · H₂N(CH₂)₆OCOCH=CHPh 355 mg (1.25 mmol) / 水溶液 50 ml を 5 分毎に順次加えた。室温で 8 時間攪拌した後、塩化ナトリウム 10 g 水溶液を加え、1 時間攪拌した後、溶液をエタノール 5 l に注いだ。目的物を沈澱させ、遠心分離した (4000R.P.M. × 15min)。沈澱を 80% エタノールで 3 回、エタノールで 1 回洗浄した後、得られた沈澱を乾燥し 9.73 g の光反応性ヒアルロン酸誘導体の白色固体を得た (DS 0.53%、エンドトキシン 0.8 pg / mg)

なお、本製造例および以下の製造例においてエンドトキシンはトキシカラーステム LS-20 セット、DIA セットおよび E t-1 セット (すべて商品名、生化学工業 (株) 製) を用いて定量した。

【0041】

製造例 2

光反応性ヒアルロン酸誘導体 (DS 0.75%) の合成

ヒアルロン酸ナトリウム (生化学工業 (株) 製、重量平均分子量 95 万) 10 g (25 mmol 2 糖単位) を水 1.5 l に溶解させた後、1, 4-ジオキサンを 750 ml 加えた。氷冷下、0.05M N-ヒドロキシスクシンイミド / ジオキサン溶液 65 ml (3.25 mmol)、0.025M EDC · HCl 水溶液 65 ml (1.625 mmol)、0.025M HCl · H₂N(CH₂)₆OCOCH=

CHPh水溶液 65 ml (1.625 mmol) を5分毎に順次加えた。室温で4時間半攪拌した後、塩化ナトリウム 10 g 水溶液を加え、1時間攪拌した後、溶液をエタノール 5 l に注いだ。目的物を沈澱させ、遠心分離した (4000R.P.M.×15 min)。沈澱を 80%エタノールで3回、エタノールで1回洗浄した後、得られた沈澱を乾燥し 9.74 g の光反応性ヒアルロン酸誘導体の白色固体を得た (DS 0.75%、エンドトキシン 5.0 pg/mg)

製造例 3

光反応性ヒアルロン酸誘導体 (DS 0.90%) の合成

ヒアルロン酸ナトリウム (生化学工業 (株) 製、重量平均分子量 95 万) 2.0 g (5.0 mmol 2糖単位) を水 300 ml に溶解させた後、1,4-ジオキサンを 150 ml 加えた。氷冷下、N-ヒドロキシスクシンイミド水溶液 69 mg (0.6 mmol) / 3 ml、EDC·HCl 水溶液 58 mg (0.3 mmol) / 3 ml、HCl·H₂N(CH₂)₆OCOCH=CHPh 水溶液 85 mg (0.3 mmol) / 3 ml を5分毎に順次加えた。室温で一昼夜攪拌した後、塩化ナトリウム 1.0 g 水溶液を加え、攪拌した後、溶液をエタノール 500 ml に注いだ。目的物を沈澱させ、遠心分離した (2500R.P.M.×10min)。沈澱を 80%エタノールで3回、エタノールで1回洗浄した後、得られた沈澱を乾燥し 2.1 g の光反応性ヒアルロン酸誘導体の白色固体を得た (DS 0.90%、エンドトキシン 2.4 pg/mg)

製造例 4

光反応性ヒアルロン酸誘導体 (DS 1.06%) の合成

ヒアルロン酸ナトリウム (生化学工業 (株) 製、重量平均分子量 95 万) 10 g (25 mmol 2糖単位) を水 1.5 l に溶解させた後、1,4-ジオキサンを 750 ml 加えた。氷冷下、0.05M N-ヒドロキシスクシンイミド/ジオキサン溶液 100 ml (5.0 mmol)、0.025M EDC·HCl 水溶液 100 ml (2.5 mmol)、0.025M HCl·H₂N(CH₂)₆OCOCH=CHPh 水溶液 100 ml (2.5 mmol) を5分毎に順次加えた。室温で4時間半攪拌した後、塩化ナトリウム 10 g 水溶液を加え、1時間攪拌した後、溶液をエタノール 5 l に注いだ。目的物を沈澱させ、遠心分離した (4000R.P.M.×15min

）。沈澱を80%エタノールで3回、エタノールで1回洗浄した後、得られた沈澱を乾燥し9.64gの光反応性ヒアルロン酸誘導体の白色固体を得た（DS1.06%、エンドトキシン31.6pg/mg）

製造例5

光反応性ヒアルロン酸誘導体（DS1.26%）の合成

ヒアルロン酸ナトリウム（生化学工業（株）製、重量平均分子量95万）5g（12.5mmol 2糖単位）を水750mlに溶解させた後、1,4-ジオキサンを375ml加えた。氷冷下、N-ヒドロキシスクシンイミド288mg（2.5mmol）/ジオキサン溶液50ml、EDC・HCl水溶液240mg（1.25mmol）/50ml、 $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{OCOCH}=\text{CHPh}$ 水溶液355mg（1.25mmol）/50mlを5分毎に順次加えた。室温で4時間攪拌した後、塩化ナトリウム5g水溶液を加え、攪拌した後、溶液をエタノール2.3lに注いだ。目的物を沈澱させ、遠心分離した（4000R.P.M.×15min）。沈澱を80%エタノールで3回、エタノールで1回洗浄した後、得られた沈澱を乾燥し4.9gの光反応性ヒアルロン酸誘導体の白色固体を得た（DS1.26%、エンドトキシン1.0pg/mg）

製造例6

光反応性ヒアルロン酸誘導体（DS1.29%）の合成

ヒアルロン酸ナトリウム（生化学工業（株）製、重量平均分子量95万）10g（25mmol 2糖単位）を水1.5lに溶解させた後、1,4-ジオキサンを750ml加えた。氷冷下、0.1M N-ヒドロキシスクシンイミド/ジオキサン溶液50ml（5.0mmol）、0.05M EDC・HCl水溶液50ml（2.5mmol）、0.05MHCl・ $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{OCOCH}=\text{CHPh}$ 水溶液50ml（2.5mmol）を5分毎に順次加えた。室温で4時間攪拌した後、塩化ナトリウム10g水溶液を加え、20分間攪拌した後、溶液をエタノール5lに注いだ。目的物を沈澱させ、遠心分離した（4000R.P.M.×15min）。沈澱を80%エタノールで3回洗浄した後、得られた沈澱を乾燥し10.0gの光反応性ヒアルロン酸誘導体の白色固体を得た（DS1.29%、エンドトキシン2.5pg/mg）

製造例 7

光反応性ヒアルロン酸誘導体 (DS 1.55%) の合成

ヒアルロン酸ナトリウム (生化学工業 (株) 製、重量平均分子量 95 万) 10 g (25 mmol 2 糖単位) を水 1.5 l に溶解させた後、1,4-ジオキサンを 750 ml 加えた。氷冷下、0.05 M N-ヒドロキシスクシンイミド/ジオキサン溶液 150 ml (7.5 mmol)、0.025 M EDC·HCl 水溶液 150 ml (3.75 mmol)、0.025 M HCl·H₂N(CH₂)₆OCOCH=CHPh 水溶液 150 ml (3.75 mmol) を 5 分毎に順次加えた。室温で 4 時間半攪拌した後、塩化ナトリウム 10 g 水溶液を加え、1 時間攪拌した後、溶液をエタノール 5 l に注いだ。目的物を沈澱させ、遠心分離した (4000 R.P.M. × 15 min)。沈澱を 80% エタノールで 3 回、エタノールで 1 回洗浄した後、得られた沈澱を乾燥し 9.92 g の光反応性ヒアルロン酸誘導体の白色固体を得た (DS 1.55%、エンドトキシン 1.2 pg/mg)

製造例 8

光反応性ヒアルロン酸誘導体 (DS 1.93%) の合成

ヒアルロン酸ナトリウム (生化学工業 (株) 製、重量平均分子量 95 万) 4.0 g (10.0 mmol 2 糖単位) を水 600 ml に溶解させた後、1,4-ジオキサンを 300 ml 加えた。氷冷下、N-ヒドロキシスクシンイミド水溶液 230 mg (2.0 mmol) / 10 ml、EDC·HCl 水溶液 192 mg (1.0 mmol) / 10 ml、HCl·H₂N(CH₂)₆OCOCH=CHPh 水溶液 284 mg (1.0 mmol) / 10 ml を 5 分毎に順次加えた。室温で一昼夜攪拌した後、塩化ナトリウム 2.0 g 水溶液を加え、攪拌した後、溶液をエタノール 3.0 l に注いだ。目的物を沈澱させ、遠心分離した (4000 R.P.M. × 15 min)。沈澱を 80% エタノールで 3 回、エタノールで 1 回洗浄した後、得られた沈澱を乾燥し 4.1 g の光反応性ヒアルロン酸誘導体の白色固体を得た (DS 1.93%、エンドトキシン 2.1 pg/mg)

製造例 9

光反応性ヒアルロン酸誘導体 (DS 2.87%) の合成

ヒアルロン酸ナトリウム (生化学工業 (株) 製、重量平均分子量 95 万) 10

g (25 mmol 2 糖単位) を水 1.5 l に溶解させた後、1,4-ジオキサンを 750 ml 加えた。氷冷下、N-ヒドロキシスクシンイミド 864 mg (7.5 mmol) / ジオキサン溶液 50 ml、EDC·HCl 水溶液 718 mg (3.75 mmol) / 50 ml、 $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{OCOCH=CHPh}$ 水溶液 1.06 g (3.75 mmol) / 50 ml を 5 分毎に順次加えた。室温で 4 時間攪拌した後、塩化ナトリウム 10 g 水溶液を加え、1 時間攪拌した後、溶液をエタノール 5.0 l に注いだ。目的物を沈澱させ、遠心分離した (4000R.P.M.×15min)。沈澱を 80% エタノールで 3 回、エタノールで 1 回洗浄した後、得られた沈澱を乾燥し 10 g の光反応性ヒアルロン酸誘導体の白色固体を得た (DS 2.87%、エンドトキシン 2.8 pg/mg)

実施例 1

本実施例は、製造例 6 で得られた DS 1.29% の光反応性ヒアルロン酸誘導体を水溶液で光架橋し、更に 1.5mM リン酸緩衝生理的食塩水 (pH7.4) で置換した光架橋ヒアルロン酸ゲルに関する。

【0042】

製造例 6 で得られた DS 1.29% の光反応性ヒアルロン酸誘導体の 1.4 重量% 水溶液を溶液層の厚さが 1.0 mm を保つように 2 枚の厚さ 2.5 mm のパイレックスガラス板に挟み、紫外線を片面 4 分ずつ合計 8 分間照射した後、45℃ で乾燥した。得られた乾燥ゲルに濃度が 2 重量% になるように 1.5mM リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4) を加え、1 日膨潤させ、光架橋ヒアルロン酸ゲルとした。

【0043】

実施例 2

本実施例は、製造例 1、4、7 で得られた光反応性ヒアルロン酸誘導体を 1.4 重量% の 1.5mM リン酸緩衝生理的食塩水溶液 (pH7.4) 中で架橋した光架橋ヒアルロン酸ゲルに関する。

製造例 1、4、7 で得られた DS 0.53、1.06、1.55% の光反応性ヒアルロン酸誘導体の 1.4 重量% の 1.5mM リン酸緩衝生理的食塩水溶液 (pH7.4) を溶液層の厚さが 1.0 mm を保つように 2 枚の厚さ 2.5 mm のパイレック

スガラス板に挟み、紫外線を片面4分づつ合計8分間照射し、光架橋ヒアルロン酸ゲルとした。

【0044】

実施例3

本実施例は、製造例1～9で得られた光反応性ヒアルロン酸誘導体を2.0重量%の1.5mMリン酸緩衝生理的食塩水溶液（pH7.4）中で光架橋した光架橋ヒアルロン酸ゲルに関する。

製造例1～9で得られたDS0.53、0.75、0.90、1.06、1.26、1.29、1.55、1.93、2.87%の光反応性ヒアルロン酸誘導体の2.0重量%の1.5mMリン酸緩衝生理的食塩水溶液（pH7.4）を溶液層の厚さが1.0mmを保つように2枚の厚さ2.5mmのパイレックスガラス板に挟み、紫外線を片面4分づつ合計8分間照射し、光架橋ヒアルロン酸ゲルとした。

【0045】

実施例4

本実施例は、製造例1、4、7で得られた光反応性ヒアルロン酸誘導体を3.2重量%の1.5mMリン酸緩衝生理的食塩水溶液（pH7.4）中で光架橋した光架橋ヒアルロン酸ゲルに関する。

製造例1、4、7で得られたDS0.53、1.06、1.55%の光反応性ヒアルロン酸誘導体の3.2重量%の1.5mMリン酸緩衝生理的食塩水溶液（pH7.4）を溶液層の厚さが1.0mmを保つように2枚の厚さ2.5mmのパイレックスガラス板に挟み、紫外線を片面4分づつ合計8分間照射し、光架橋ヒアルロン酸ゲルとした。

【0046】

（光反応性ヒアルロン酸誘導体溶液及び光架橋ヒアルロン酸ゲルの物性測定）

製造例1、4、5および7で製造した光反応性ヒアルロン酸誘導体の調製濃度（溶液濃度）が1.4、2.0、および3.2重量%のもの、および実施例2～4で製造した調製濃度が1.4、2.0、および3.2重量%の光架橋ヒアルロン酸ゲルについて粘弾性、粘度、吸水率を測定した。粘弾性及び粘度は、Carri-Med社製レオメーターCSL-50型を用いて測定した。

【0047】

粘弾性の測定条件を以下に示す。

測定法：オシレーションテスト法、ストレスコントロール

測定温度：37℃

測定ジオメトリー：4 cm

ギャップ：800 μm

周波数：10 Hz

測定項目：貯蔵弾性率 (G')、損失弾性率 (G'')

損失正接 $\tan \delta$ (G'' / G')、動的粘度 (η)

架橋している割合を、架橋率として算出した。架橋率は下記式によって定義される。

【0048】

架橋率 (%) = ケイ皮酸二量化体モル数 $\times 2$ / 導入ケイ皮酸モル数 $\times 100$

架橋率の算出の具体的方法として、光架橋ヒアルロン酸ゲルからケイ皮酸あるいはその二量化体を化学的方法により切断、抽出し、得られた抽出物をラベル化し、GPCによりその分子量の差からケイ皮酸と二量化体を分離、定量し、それぞれのモル数を求めることにより上記式から架橋率を算出した。

【0049】

又、架橋点は以下の式として表すことが出来る。

架橋点 (%) = DS \times 架橋率 / 100

架橋率は上記式より導入ケイ皮酸に対する値であるが、該架橋率とDSの積である架橋点は、ヒアルロン酸の構成2糖単位当たりの二量化体のモル比 (%) として表現できる。

【0050】

吸水率については、ヨーロッパ特許条約出願公開、EP0205674A1記載のBlue Dextran (以下B.D.) を用いたUV法により算出し、水性媒体として生理食塩水 (0.9%塩化ナトリウム水溶液) を用いた。

B.D. 溶液の中に乾燥したゲルを入れると分子量の大きなB.D.は、ゲル中に進入出来ず水のみがゲル中に吸収される。このため吸収されていないB.D.溶液の濃度

は、吸水された分、初期濃度より濃くなり、この濃度差を吸光度（610nm）より算出する事により吸水率が下記式より求められる。

【0051】

0.1重量%のB.D.溶液1g当たりA mgの乾燥ゲルを入れる。この初期濃度における吸光度をy1とし、ゲルを24時間膨潤させた後の吸光度をy2とすると、吸水率は以下の式により算出される。

$$\text{吸水率} (\times 100\%) = (1 - y1/y2) / A \times 1000$$

なお、吸水率を求めた検体としては、実施例3においてDSが0.53、0.75、0.90、1.26、1.55、1.93%の光反応性ヒアルロン酸誘導体より得られた光架橋ヒアルロン酸ゲルを乾燥したものを使用した。

【0052】

粘弾性、架橋率、架橋点等の結果を表1に、DSと吸水率の関係を図2に示す。なお、表1の実測濃度の項目はカルバゾール硫酸法でゲルのヒアルロン酸成分を測定して求めた。

【0053】

【表 1】

表 1

備考		製造 例	調製 濃度 重量%	実測 濃度 重量%	DS 架橋率 架橋点			10Hz			
								G'	G''	tan δ	η
					%	%	%	Pa	Pa	Pa · s	
未架橋	比較例	1	1.4	1.16	0.53	—	—	61	39	0.63	0.6
		4	1.4	1.23	1.06	—	—	101	52	0.51	0.8
		7	1.4	1.20	1.55	—	—	133	65	0.49	1.0
		1	2.0	1.82	0.53	—	—	149	76	0.51	1.2
		4	2.0	1.88	1.06	—	—	314	102	0.33	1.6
		5	2.0	1.97	1.26	—	—	258	99	0.38	1.57
		7	2.0	1.70	1.55	—	—	281	100	0.36	1.6
		1	3.2	2.63	0.53	—	—	468	194	0.42	3.1
		4	3.2	2.77	1.06	—	—	726	235	0.32	3.7
		7	3.2	2.78	1.55	—	—	807	237	0.29	3.8
架橋	実施例 2	1	1.4	1.22	0.53	36	0.19	66	41	0.63	0.7
		4	1.4	1.37	1.06	28	0.30	146	65	0.45	1.0
		7	1.4	1.24	1.55	25	0.39	149	64	0.43	1.0
	実施例 3	1	2.0	1.96	0.53	39	0.21	146	78	0.53	1.2
		4	2.0	1.81	1.06	13	0.14	339	109	0.32	1.7
		5	2.0	1.70	1.26	18	0.23	273	96	0.35	1.5
		7	2.0	2.04	1.55	22	0.34	342	105	0.31	1.7
		9	2.0	1.62	2.87	15	0.43	427	103	0.24	1.7
	実施例 4	1	3.2	2.63	0.53	67	0.36	550	216	0.39	3.4
		4	3.2	2.77	1.06	18	0.19	818	223	0.27	3.5
		7	3.2	2.78	1.55	14	0.22	1002	248	0.25	3.9

【0054】

実験例

本実験例は実施例 1 及び実施例 3 で得られたゲルならびに比較例として実施例 1 と実施例 3 において紫外線照射前の光反応性ヒアルロン酸誘導体溶液（以下、未架橋ヒアルロン酸ゲルという）および市販品である TC 7（インターシード（商品名、ジョンソン アンド ジョンソン社製））による子宮角癒着モデルを用いた癒着防止効果を示すものである。

【0055】

1. 実験動物

C r j : S D 系 (S P F .) 雌性ラットを7週齢で購入し、1週間の予備飼育を行った後、本試験に使用した。

2. 試験方法

2-1. ラット子宮角癒着モデルの作成

ネンブタール麻酔下でラット腹部を毛刈した後、約4 cm正中切開し、

a) ラットの右腹壁を眼科用トレパンで筋層まで切り抜き、筋層をピンセットで剥離した。

【0056】

b) 子宮角を露出させた後、卵巣から子宮頸部に向かって約1 cmのところから2~3 mm間隔で4箇所横切開を加え、傷口は電気メスで随時止血した。

c) 子宮角横切開部端より約3~4 mmの場所と、腹壁欠損部端より同じく3~4 mmの場所を8/0の糸でひと針縫合し、a) と b) で作成した各切創部を近づけた。

【0057】

2-2. 投与方法

腹壁欠損部と子宮角切創部の間に上記の光架橋ヒアルロン酸ゲル及び未架橋ヒアルロン酸ゲルを1 ml 並びに市販品であるTC7を $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$ 挟み込み投与群とした。。

上記ゲルの具体的投与方法としては正確に秤量した上記ゲル1 ml をシリンジ(テルモシリンジ(商品名)、 γ 線滅菌済み、1 ml ツベルクリン用、シリンジ内径約4 mm、シリンジ先端内径約1 mm)に採り、シリンジ先より腹壁欠損部と子宮角切創部間に注入する方法を用いた。

【0058】

又、左側子宮角と腹壁も2-1と同様の方法により欠損させ、こちらには何も挟み込まず対照群とした。

3. 評価方法

埋め込み7日後にラットをエーテル麻酔下で頸動脈より放血屠殺後解剖し、癒

着発生部位を癒着の強度により以下に示す各スコア（0～3）で評価した。

【0059】

0：癒着無し。1：軽度の癒着。容易に剥離可能。2：中度の癒着。剥離可能。
。3：重度の癒着。剥離不可能。

4. 結果

表2に結果を示す。

【0060】

【表2】

表2：子宮角癒着モデルによるヒアルロン酸ゲル等の癒着防止効果

試料	投与群	対照群
光架橋ヒアルロン酸ゲル (実施例1) DS1. 29% UV 8分照射	0 0 0 0 0	2 2 2 2 2
未架橋ヒアルロン酸ゲル (比較例) DS1. 29% UV照射前	2 2 2 2 2	2 2 2 2 2
光架橋ヒアルロン酸ゲル (実施例3) DS1. 06% UV 8分照射	1 1 0 0 0	2 2 2 2 2
光架橋ヒアルロン酸ゲル (実施例3) DS1. 26% UV 8分照射	2 0 0 0 0	2 2 2 2 2
未架橋ヒアルロン酸ゲル (比較例) DS1. 26% UV照射前	2 2 2 2 0	2 2 2 2 2
光架橋ヒアルロン酸ゲル (実施例3) DS1. 55% UV 8分照射	0 0 0 0 0	2 2 2 2 2
光架橋ヒアルロン酸ゲル (実施例3) DS2. 87% UV 8分照射	0 0 0 1 0	2 2 2 2 2
TC7 (比較例)	2 2 2 2 2	2 2 2 2 2

【0061】

表2の結果より本癒着モデルにおいては市販品の癒着防止膜TC7は全く効果を示さなかったが、光架橋ヒアルロン酸ゲルは本モデルにおいても十分に癒着防止に有用な効果を示すことが分かる。

又、光架橋と未架橋のゲルについて同様の粘弾性および粘度を有しながら、未架橋ヒアルロン酸ゲルについては効果がみられなかったことから、本光架橋ヒアルロン酸ゲルは光架橋することで癒着防止効果を示すものと考えられる。

【0062】

【発明の効果】

以上説明したように、光反応性ヒアルロン酸誘導体の高濃度水溶液に紫外線を照射することにより、光架橋ヒアルロン酸ゲルを容易に製造することができる。

また本発明の光架橋ヒアルロン酸ゲルは、ヒアルロン酸本来の無毒性、非抗原性、生体適合性、生体内分解性といった優れた性質を保持しつつ、適度な粘弾性、組織親和性、生体内分解性等の物性を有しているので、安全性の高い医用材料、たとえば、癒着防止材、薬剤の徐放性担体等として種々の分野の適用が期待できる。さらに該ゲルはシリンジやチューブ等によって細部の患部への注入が可能でありマイクロサージェリー等への適用が期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

光反応性ヒアルロン酸誘導体溶液における架橋の概念図を示す。

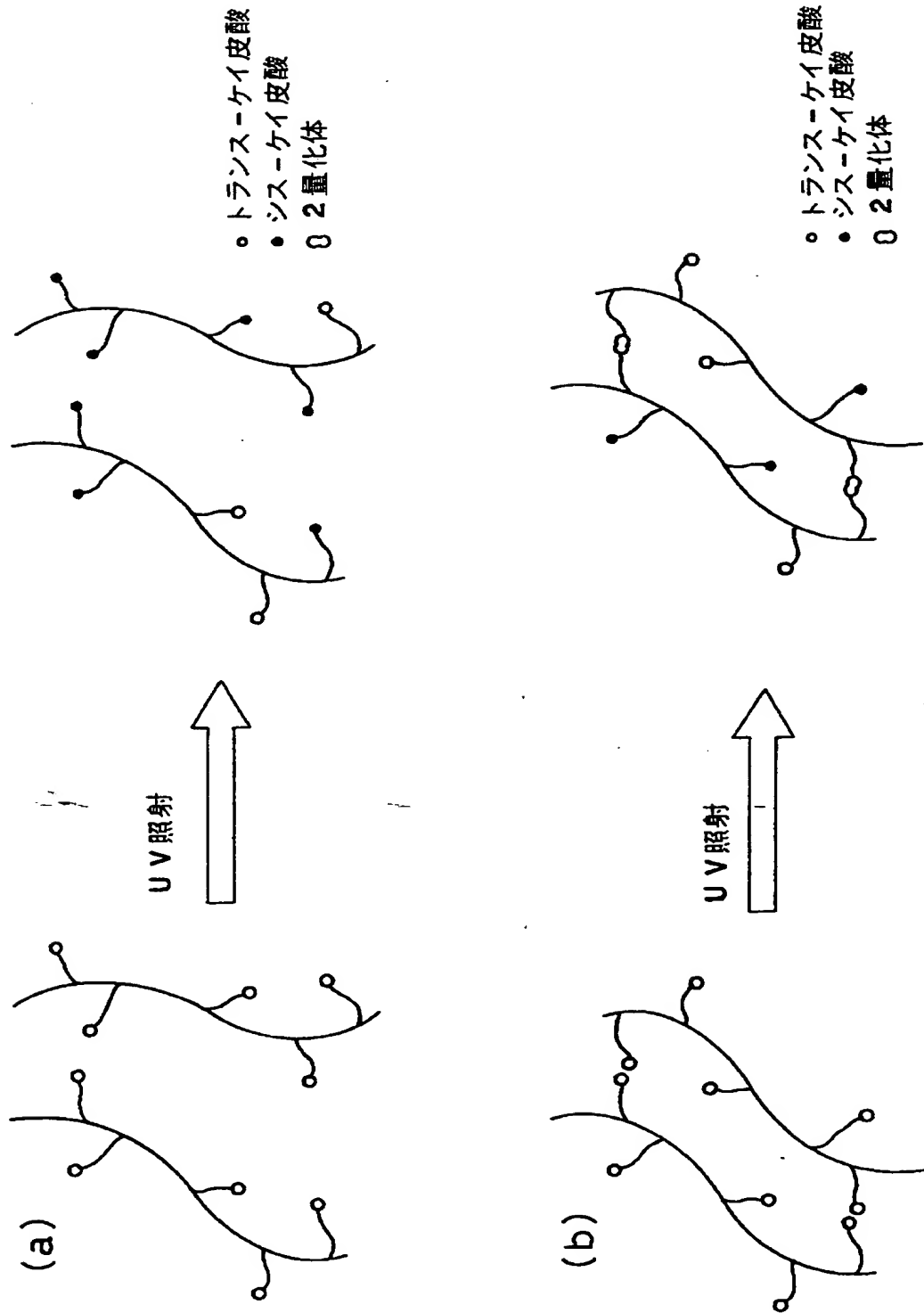
【図2】

光架橋ヒアルロン酸ゲルのDSと吸水率との関係を示すグラフである。

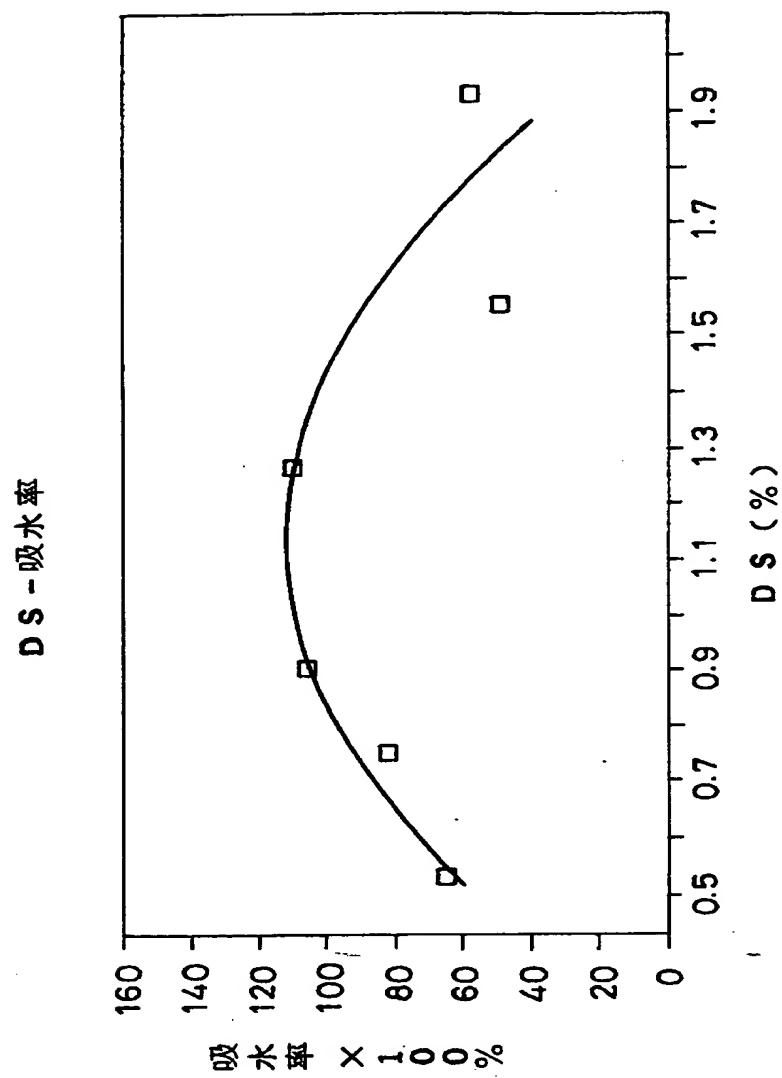
【書類名】

図面

【図1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 網目構造に水性媒体を含む光架橋ヒアルロン酸ゲル及びそれを容易に製造する方法、安全性、生体適合性に優れかつ生体内分解性を有する、光架橋ヒアルロン酸ゲルからなる注入可能な医用材料を提供すること。

【解決手段】 周波数10Hzにおける貯蔵弾性率(G')が50~1500Pa、損失弾性率(G'')が10~300Pa、および損失正接(G''/G')が0.1~0.8である光架橋ヒアルロン酸ゲル；架橋点がヒアルロン酸の構成2糖単位当たり0.1~0.5%である光架橋ヒアルロン酸ゲル；およびそれら光架橋ヒアルロン酸ゲルからなる医用材料；光反応性架橋基を結合した光反応性ヒアルロン酸誘導体の0.5~10重量%水性媒体溶液に紫外線を照射する前記光架橋ヒアルロン酸ゲルの製法。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000195524

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

【氏名又は名称】 生化学工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100073874

【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目12番32号 アーク森ビル
28階 栄光特許事務所

【氏名又は名称】 萩野 平

【代理人】 申請人

【識別番号】 100081075

【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目12番32号 アーク森ビル
28階 栄光特許事務所

【氏名又は名称】 佐々木 清隆

【代理人】 申請人

【識別番号】 100066429

【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目12番32号 アーク森ビル
28階 栄光特許事務所

【氏名又は名称】 深沢 敏男

【代理人】 申請人

【識別番号】 100093573

【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目12番32号 アーク森ビル
28階 栄光特許事務所

【氏名又は名称】 添田 全一

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000195524]

1. 変更年月日	1990年 8月20日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号
氏 名	生化学工業株式会社